

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Institut de Botanique générale

FACULTÉ DES SCIENCES
Directeur : Professeur F. CHODAT

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS
DU LATEX D'EUPHORBIA CYPARISSIAS L. ET DE
CHELIDONIUM MAJUS L.**

THÈSE
PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES
PAR

Ali-Reza MEHRAN

de TÉHÉRAN (Iran)

Thèse N° 1291

GENÈVE
IMPRIMERIE GENEVOISE

Juillet 1958

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Institut de Botanique générale

FACULTÉ DES SCIENCES
Directeur : Professeur F. CHODAT

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS
DU LATEX D'EUPHORBIA CYPARISSIAS L. ET DE
CHELIDONIUM MAJUS L.**

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

Ali-Reza MEHRAN

de TÉHÉRAN (Iran)

Thèse N° 1291



GENÈVE
IMPRIMERIE GENEVOISE

Juillet 1958

La Faculté des Sciences, sur le préavis de Monsieur le Professeur Fernand Chodat, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, 12 juillet 1958.

Le Doyen : F. CHODAT.

Thèse No 1291.

A MES PARENTS

*en témoignage de dévouement, de profonde
gratitude et de respectueuse reconnaissance*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552321_0124

A MA CHERE FEMME

*en témoignage de mon affection
et de mes remerciements les plus sincères*

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, nous sommes heureux de pouvoir exprimer ici nos sincères remerciements à M. le Professeur F. CHODAT, directeur de l'Institut de Botanique générale et de Microbiologie de l'Université de Genève, qui a bien voulu nous accueillir dans son institut, nous confier cette tâche et accepter sa direction. Sa longue expérience et ses précieux conseils nous ont guidé au cours de ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous ne saurons qu'adresser nos remerciements à M. le Professeur R. CORTESI et à M. le Docteur G. TURIAN, qui ont bien voulu s'intéresser à ce travail et nous témoigner leur bienveillance au cours de nos recherches.

Sans l'obligeance et les judicieux conseils en matière de chromatographie de M. P. BAUDET, docteur ès sciences, nous ne serions pas parvenu à mener à bien nos travaux. Nous le prions donc d'accepter l'expression de notre vive reconnaissance.

I. — PARTIE GENERALE

1. INTRODUCTION

Le problème que nous avons abordé expérimentalement dès 1955 était d'examiner les répercussions éventuelles d'une maladie (rouille) de l'*Euphorbia cyparissias* L. sur la composition de son latex. Cette maladie détermine des malformations foliaires et florales (castration) bien connues. Il nous a paru alors que le latex devait refléter, à son tour et sur le plan biochimique, certaines modifications dues à l'infection de l'euphorbe par la rouille. La première de ces modifications atteint la quantité de latex qui est beaucoup plus faible chez les plantes malades que chez les plantes saines.

L'étude du latex est celle d'un mélange extraordinairement riche en substances diverses. Face à cette complexité, il fallait choisir un secteur bien défini et nous nous sommes arrêté à l'analyse des acides aminés par voie chromatographique. Nous avons étendu nos recherches au latex d'une autre plante commune dans nos régions : la chélidoine. Dans ce cas, il ne s'agissait que de plantes saines.

Au cours de ces quelques années, nous avons employé successivement des méthodes chromatographiques toujours plus fines : chromatographie sur papier monodimensionnelle, bidimensionnelle, puis chromato-ionophorèse.

Tant par la complexité de la matière étudiée que par celle des techniques d'investigation, le sujet de notre étude s'est révélé très vaste. Nous avons donc pleinement conscience du caractère insuffisant de ces recherches. Nous avons pourtant eu l'avantage de faire diverses constatations inédites, qui nous paraissent ouvrir la voie à d'autres recherches et mériter d'être livrées dès maintenant à la publication.

2. DEFINITION DU LATEX

Les auteurs définissent souvent le latex comme une émulsion d'essences dans une solution aqueuse extrêmement complexe (GUILLERMOND, MANGENOT). Cette description laconique élimine intentionnellement la signification de ce fluide pour la plante. En effet, les opinions ont beaucoup varié quant à la signification du latex dans l'économie du végétal. Deux thèses s'opposent : déchet ou suc participant à la vie physiologique de la plante.

Les observations que nous avons faites au cours de ces recherches nous rangent dans le groupe de ceux qui attribuent une signification biologique au latex. Les deux rôles simultanés ne s'excluent pas nécessairement : le latex contient côte à côte des substances qui ne sont plus métabolisantes par la plante, pour autant que nous le sachions, et d'autres qui le sont encore.

Ces remarques nous engagent à donner la définition suivante : le latex est un liquide complexe de certaines plantes, qui se trouve dans les cellules ou tissus spéciaux appelés laticifères. Ce produit est le résultat de l'activité continuelle, mais variable, de ces tissus qui sont en relation biologique avec les cellules voisines et très probablement le phloème. La couleur blanche de la plupart des latex provient de l'état d'émulsion de quelques constituants de ce fluide. La physiologie de ce système défini est encore mal connue. Le latex n'est certainement pas un mélange inactif et inutile pour la plante.

3. FAMILLES DE PLANTES A LATEX

Le tableau N° 1 situe dans leur position systématique les familles d'Angiospermes qui, dans leur ensemble ou pour une partie tout au moins, possèdent ce tissu anatomique, réservoir d'une sève aux fonctions physiologiques encore mystérieuses : le latex.

TABLEAU 1

CLASSIFICATION GENERALE DES FAMILLES A LATEX

S. classe	Série	Ordre	Famille
		Spadiciflores	→ Aracées
Apétales	→ Périanthées	→ Urticales	→ Cannabinacées
			→ Moracées
		→ Pariétales	→ Papaveracées
Dialypétales	→ Thalamiflores	→ Euphorbiales	→ Caricacées
			→ Euphorbiacées
	Pentacycliques	→	→ Sapotacées
	↑		→ Apocynacées
Gamopétales		→ Gentianales	→ Asclepiadacées
		→ Tubiflorales	→ Convolvulacées
	↓		
	Tétracycliques		
		O.S.	
		↑	
		→ Campanales	→ Campanulacées
		O.I.	
		→ Synanthérales	→ Liguliflores

Les Angiospermes ne sont toutefois pas les seules plantes génératrices de latex. Nombreux sont les genres de Basidiomycètes (*Lactaria*, *Russala*) et d'Ascomycètes (*Galactinia*) qui ont des laticifères comparables à ceux des Papaveracées. L'étrange distribution systématique de ces dispositifs anatomiques et de ces sécrétions pose un problème d'ordre phylogénique présentement insoluble.

A la seule famille des Monocotylédones mentionnée, il y a lieu d'ajouter celle des Musacées.

Nous voudrions signaler ici une observation très curieuse due au R. CORTESI : la coïncidence chez un grand nombre de familles, de laticifères et de liber péri-médullaire.

Si l'on pousse cette remarque plus loin, on constate que les seules sous-familles d'Euphorbiacées qui ont un liber interne, sont aussi celles qui possèdent des laticifères (Crotonées et Euphorbiées). Le même rapport se retrouve chez les Chicoracées et les Radiées dans la famille des Composées.

T A B L E A U 2

LISTE DES FAMILLES POSSEDANT LES LATICIFERES D'APRES METCALFE ET CHALK

Apocynacées	Convolvulacées	Moracées
Asclepiadacées	Eucommiacées	Nymphaeacées
Cactacées	Euphorbiacées	Olacacées
Campanulacées	Flacourtiacées	Oléacées
Cannabinacées	Hippocrateacées	Papaveracées
Caricacées	Icacinacées	Urticacées
Composées	Lobeliacées	

4. TISSUS A LATEX

Bien que cette étude ne soit pas à proprement parler anatomique, il nous semble nécessaire de fournir quelques indications sur les appareils fournisseurs du latex. Cette précaution est d'autant plus nécessaire qu'il existe une grande confusion dans la nomenclature de ces tissus rencontrés dans les plantes les plus diverses.

D'une façon générale, les laticifères, s'ils ne sont pas en cellules isolées, se présentent sous la forme de longs tubes simples ou en réseau. Ce tissu parcourt la plante des racines aux feuilles et se situe principalement dans les parenchymes. Seule l'écorce (*Euphorbia*), parfois seule la moelle (*Ceropegia*) et parfois tous les tissus primaires, sont dotés de laticifères (*Nerium*).

Ces tubes ont une paroi propre, un protoplasme, et de nombreux noyaux collés contre la paroi. Ces éléments peuvent donc être qualifiés de polyénergides suivant la terminologie de SACHS, et possèdent une structure céno-cytique. Les polyterpènes, constituants caractéristiques de certains latex, ne peuvent pas franchir les membranes cellulaires et être rejetés à l'extérieur. Ils s'accumulent en conséquence dans la cellule et plus particulièrement dans la vacuole. Dans l'élément adulte, le cytoplasme est distribué en un manchon périphérique, riche en organites, et une sorte de canal vacuolaire formé par le latex (voir figure 1). Il n'existe pas de véritable circulation du latex. Ce dernier se déplace par écoulement lors des incisions.

Nous adopterons la nomenclature suivante pour classer les divers types de tissus laticifères :

1) *Laticifères-galactocytes* (*unicellulaires*)

Ils dérivent d'une cellule embryonnaire unique qui s'allonge en multipliant ses noyaux, sans jamais se cloisonner. Les cellules génératrices de ces laticifères apparaissent déjà dans l'embryon sous forme de cellules volumineuses et différenciées, situées à la frontière intérieure de l'écorce primaire. Les cellules laticifères ini-

tiales croissent avec les jeunes plantules, se ramifient abondamment et pénètrent le parenchyme de la jeune plante. Par ailleurs, la croissance de ces tubes dépend de celle des cellules voisines. On a comparé ce phénomène à celui de la pénétration des hyphes d'un champignon parasite.

Ces tissus, dérivés de la croissance et des ramifications d'une seule cellule, portent le nom de laticifères-galactocytes. Ils s'opposent aux catégories suivantes nées de la fusion de plusieurs cellules.

Les familles végétales caractérisées par ce type d'appareil laticifère-galactocyte sont : les Moracées, Urticacées, Euphorbiacées (sauf *Hevea* et *Manihot*), Apocynacées et Asclépiadacées.

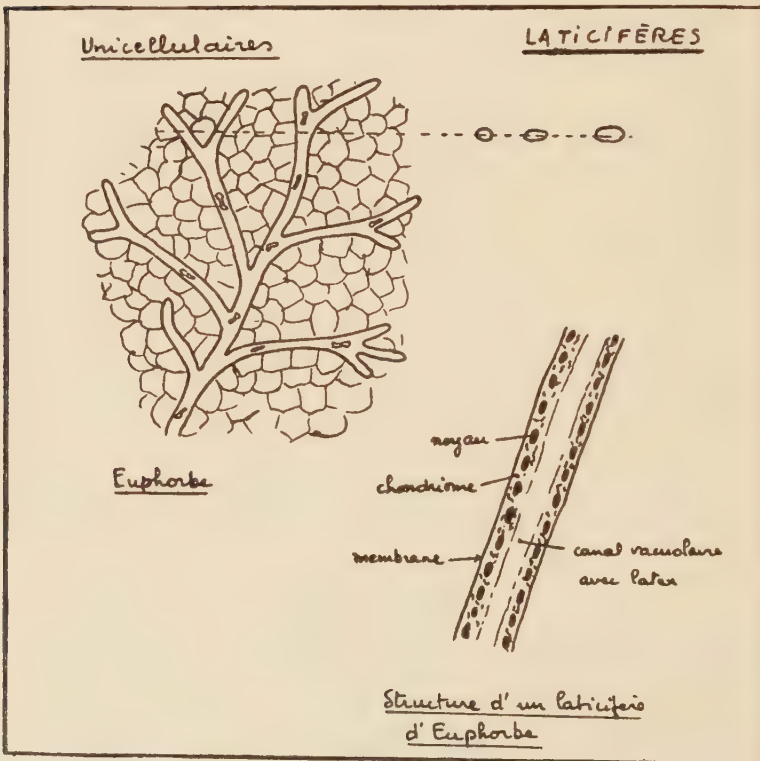


FIG. 1

2) Laticifères pluricellulaires

Le réseau est ici constitué par la fusion de cellules voisines différenciées dans le sens galactogène. Suivant le degré de perfection de ces anastomoses, on distinguera :

a) Les laticifères-inarticulés, c'est-à-dire des ensembles de cellules soudées les unes aux autres et dont les parois contiguës ont été entièrement résorbées. Anatomiquement, on reconnaît encore, sous forme d'un bourrelet annulaire, le siège de l'ancien septum. Ce type se rencontre principalement chez les Chicoracées, certaines Euphorbiacées, Cannabinacées, etc.

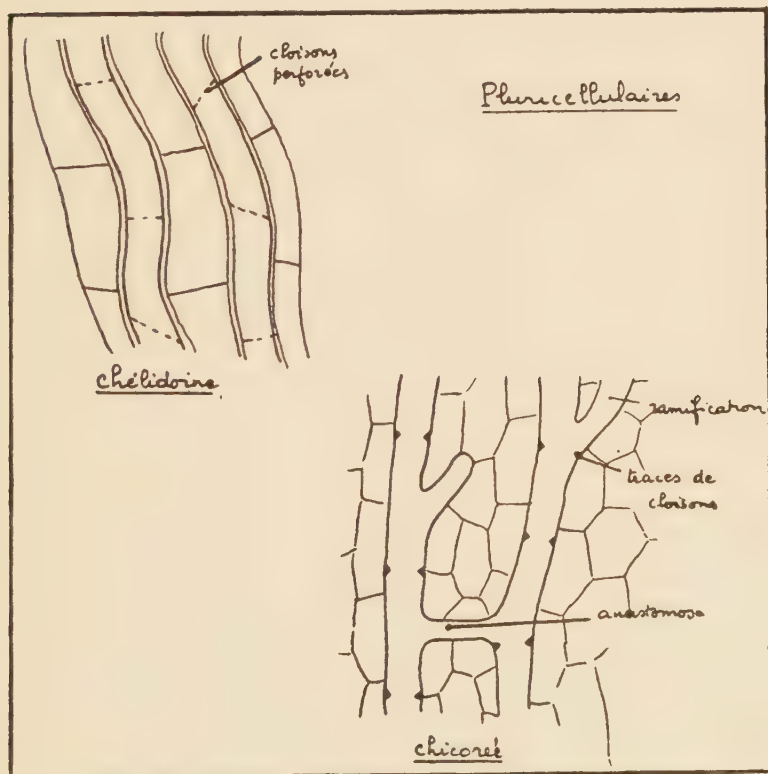


FIG. 2

b) Les laticifères-articulés constituent des réseaux de même origine que les inarticulés, mais avec conservation partielle des parois d'anastomose : en fait, ces parois présentent une perforation assurant la communication du latex d'élément à élément. Les familles suivantes possèdent des systèmes laticifères de ce type : Papaveracées, Papayacées, Campanulacées et le genre *Hevea* chez les Euphorbiacées.

Les laticifères pluricellulaires prennent naissance à partir de tissus primaires. Parfois ils dérivent du cambium et sont nommés laticifères secondaires, par exemple dans les genres *Hevea* et *Manihot*.

5. INFORMATIONS GENERALES SUR LA COMPOSITION DU LATEX

Il est difficile de donner une information générale sur la composition des latex en raison du nombre très élevé des plantes productrices de cette sève particulière. On ne compte pas moins de 500 espèces productrices de caoutchouc. A côté de ces dernières, très nombreuses encore sont les plantes dont les latex sont pauvres ou dépourvus de caoutchouc.

Les informations acquises proviennent principalement des plantes d'intérêt économique (Hevea, Papaver, Ficus, etc.).

Il est curieux cependant que la première analyse du latex, faite en 1797 par CHAPTAL, concerne l'*Euphorbia cyparissias* L. que nous étudions dans ce travail !

Les éléments qui se trouvent dans le latex peuvent être groupés en quatre catégories selon leur état vis-à-vis de l'eau.

En vraie solution :

- Sels minéraux.
- Acides organiques et leurs sels.
- Glucides.
- Pigments.
- Acides aminés.
- Alcaloïdes.

En fausse solution :

- Gommés.
- Protéines et polypeptides.
- Enzymes.

En émulsion :

- Lipides, Stérines.
- Résines.
- Corps terpéniques.

En suspension :

- Amidon.

En général, les latex sont très riches en eau : 50 à 85 %. Les Cannabinacées et quelques Moracées (*Morus*) ont des latex hyalins et limpides. Les Euphorbiacées, par contre, possèdent le latex le plus concentré. TOBLER a montré que les feuilles d'ombre et les feuilles âgées ont un latex aqueux. Selon cet auteur, la production du latex dépend de la photo-synthèse. On trouve de grandes quantités de sels minéraux dans le latex. Cette teneur correspond, pour les euphorbes indigènes, à une solution de 3 % de Cl_2Ca . On a également mentionné la richesse du latex en Mg. sous forme de sulfate dans le *Kickxia elastica* Preuss.

Les *acides organiques* jouent un rôle important comme véhicule des alcaloïdes. Le latex d'*Euphorbia caput medusae* contient beaucoup de malate de Ca. facilement cristallisable.

Des quantités appréciables de sucres ont été identifiées dans les latex de *Tragopogon* et de *Brosimum galactodendron*. On rencontre aussi jusqu'à 2,8 % d'une gomme sucrée.

Les plantes à latex pigmenté sont beaucoup moins nombreuses : citons parmi elles la sanguinaire du Canada et la chélidoine d'Europe. Nombreux sont encore les latex blancs qui accusent des fluorescences en lumière ultraviolette.

Certains latex sont riches en alcaloïdes, par exemple le pavot. D'autres latex, celui de *Hevea*, sont pauvres ou ne possèdent aucun alcaloïde.

BRUSCHI a observé que la teneur en lipides du latex varie à la suite d'incisions (caoutchouc). On trouve aussi fréquemment, dans le latex, des stérines : jusqu'à 1 % chez *Hevea*. Ces corps ont été confondus au début avec des résines en raison de leur solubilité dans l'alcool.

Certaines plantes tropicales contiennent une quantité considérable de lipides et de cires solubles dans l'éther, mais peu solubles dans l'alcool. Ces substances peuvent

atteindre 84,1 % du résidu sec (*Brosimum galactodendron* D. Don).

Les composants terpéniques du latex ont été beaucoup étudiés à cause de leur valeur industrielle : le caoutchouc de nombreuses espèces, le guttène de la *Gutta Percha*, etc. La concentration de ces substances est très variable ; elle peut atteindre, chez des arbres âgés qui sont incisés pour la première fois (*Hevea*), 60 % du latex. Ce dernier est alors presque une pâte épaisse. Lorsque l'arbre est régulièrement incisé, le titre est plus faible : environ 37 %.

Les grains d'amidon, volumineux et de formes si particulières, suspendus dans le latex, ont aussi fait l'objet de plusieurs recherches. Bornons-nous à rappeler que ces grains d'amidon sont exceptionnellement mobilisés. Il est difficile de se faire une opinion sur l'augmentation de ces figures. On sait que la fluidité du latex est plus grande dans la portion centrale des laticifères. Cette zonation d'une part, les variations de pression d'autre part, rendent très inégal le nombre des grains d'amidon dans le latex récolté.

Les matières protéiques sont également présentes dans le latex. Elles ont été étudiées surtout dans les latex d'usage industriel à cause de leur importance technique dans le phénomène de la coagulation. L'analyse du latex d'*Hevea* régulièrement incisé, accuse 0,34 % de protides. Cette teneur peut s'élever dans certains cas jusqu'à 0,6 %. Il suffit de passer à une autre plante pour enregistrer des titres tout différents : *Ficus callosa* Willd. contient jusqu'à 26,6 % de protides représentant le 90,7 % du poids sec. Cette dernière valeur est un peu plus faible chez le *Ficus cordifolia* Roxb. : 79,5 %. Il arrive que ces substances se présentent à l'état cristallisé dans le latex. Des peptones ont été reconnus dans le latex de *Kickxia*. Nous montrerons, au cours de ce travail, l'existence de polypeptides dans les latex d'*Euphorbia cyparissias* L. et de chélidoine. Selon FRANK, l'hydrolyse des protéines du latex d'*Hevea* fournit, entre autres, du tryptophane et de la cystéine. Les études qui suivent donneront de

nouvelles précisions au sujet de ces hydrolyses. Au point de vue physiologique, ces substances sont encore presque inconnues.

Quant aux acides aminés présents à l'état libre dans le latex, ou à ceux qui dérivent de l'hydrolyse des protides, il n'en est fait mention nulle part, à notre connaissance. C'est précisément l'objet de ces premières recherches que d'apporter une information à ce propos.

Arrivé au contact de l'air, le latex s'épaissit et subit spontanément des modifications dans sa structure physiques et dans sa composition chimique. Ces modifications sont catalysées par des enzymes divers, souvent en concentration élevée dans le latex. Il suffit de rappeler les teintes roses, bleues, puis noires, prises successivement par le latex des champignons, pour signaler le rôle important des phénol-oxydases jointes aux divers constituants du latex. Plus célèbre, parce qu'à l'origine de l'industrie de la laque du Japon, est l'enzyme qui oxyde l'urushiol, diphénol présent dans le latex du *Rhus vernicifera*. Le mélanisme caractéristique de cette transformation n'est d'ailleurs pas la seule opération enzymatique qui participe à la formation de la laque.

Les coagulations plus ou moins rapides dont divers latex sont l'objet peu après leur sortie des laticifères sont encore dues à des actions enzymatiques. Nous avons ici affaire au monde des protéases qui interviennent directement ou indirectement dans ces changements d'état physique. L'opium est recueilli sous forme d'une larme coagulée de latex de pavot. Le latex d'*Hevea* coagule spontanément après sa sortie de l'écorce. On sait que les gouttelettes de caoutchouc sont, in vivo, entourées d'un film riche en protéines qui se détruit au contact de l'air en même temps que s'acidifie le latex : la coagulation, phénomène d'ailleurs complexe, surgit. Elle peut être accélérée par l'addition d'acide acétique ou retardée par l'ammoniaque qui conserve au latex d'*Hevea* sa fluidité originale.

Bien connue aussi est la papaïne du latex de *Carica Papaya*. Cette protéase, agissant en milieu faiblement acide, se retrouve d'ailleurs à l'état plus ou moins pur dans les latex d'euphorbe et de figuier. Dans le *Carica* elle est accompagnée de peptidases efficaces en milieu alcalin. Les phycochymases, sortes de labferment tiré du figuier, exercent une action coagulante sur l'édifice colloïdal du lait. Les populations de la Méditerranée et du Proche-Orient l'utilisent pour la préparation des fromages. On a encore mentionné des amylases, des lipases, des béta-glycosydases dans divers latex.

Nous montrerons dans notre étude l'intervention d'un nouveau type d'enzyme, les aminooxydases, décelées par la disparition des taches chromatographiques ninhydrine positive.

G. TURIAN ¹⁾ a comparé l'activité phosphatasique acide des latex d'*Euphorbia verrucosa* saine et rouillée par *Uromyces scutellatus*. L'infection a pour effet d'élever nettement le titre de l'enzyme dans le latex de la plante malade (près du double au bout de 90 minutes). L'auteur montre encore que l'addition d'hétéroauxine ($M.10^{-3}$) au latex sain augmente son activité phosphatasique. Cette dernière observation confirme de précédentes expériences tendant à prouver la stimulation par l'hétéroauxine de l'activité phosphatasique de tissus végétaux (TURIAN).

Ces constatations rejoignent une expérience faite par P.-E. PILET ²⁾. Cet auteur a montré que les feuilles d'*Euphorbia cyparissias* L., prélevées sur une plante parasitée par *Uromyces pisi*, sont plus riches en hormones de croissance et conservent plus longtemps cette concentration élevée que les feuilles saines.

1) G. TURIAN. Exaltation de l'activité phosphatasique dans le latex d'*Euphorbia verrucosa* L. parasitée par *Uromyces scutellatus* (Schr.) Lév. Ses relations avec le métabolisme auxinique. *Phytopathologische Zschr.*, Bd 28, H. 3, S. 275 (1957).

2) P.-E. PILET. Etude physiologique du parasitisme de l'*Uromyces Pisi* (pers.) de By, sur l'*Euphorbia cyparissias* L. *Experientia*, Vol. IX/8, p. 300 (1953).

Les travaux de PILET et ceux de TURIAN mettent en évidence la perturbation provoquée par la rouille dans l'économie enzymatique des tissus d'Euphorbes. Ils rejoignent par conséquent les résultats que nous consignons ici sur les enzymes affectant la dégradation des protéines. Si la cause initiale de ces troubles est unique, la parasitisme, il n'en reste pas moins que les conséquences dans le tableau biochimique et enzymatique des tissus est extrêmement complexe. Entrevu, ce problème ne trouvera sa solution que lorsque nous serons mieux informés sur le métabolisme dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire l'économie enzymatique du latex de plantes saines.

On trouvera dans les ouvrages de F. CZAPEK, FREY-WYSSLING, N. WATTIEZ, F. STERNON, E. PERROT et GOODING les indications classiques relatives aux constituants des latex. Il serait souhaitable qu'une compilation des données parues, en particulier dans les publications techniques, soit faite dans ce domaine.

II. — TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER¹

Dans la chromatographie sur papier, la séparation des substances se trouvant dans un spot est en relation directe avec leur coefficient de partage, entre une phase mobile, soit le solvant organique, et une phase aqueuse, mais stationnaire, constituée par le papier saturé d'eau. Ici, donc, les conditions sont les mêmes que dans la chromatographie sur colonne de MARTIN et SYNGE, mais le gel de silice est remplacé par la cellulose du papier qui a l'avantage d'être plus pratique et plus sensible pour la révélation et le dosage. En effet, la sensibilité pour les amino-acides passe de l'ordre du milligramme au gamma. L'emplacement de chaque substance sur le chromatogramme, pour un solvant donné, est caractérisé par son Rf.

$$\text{Rf} = \frac{\text{déplacement de corps dissous}}{\text{déplacement du front du solvant}}$$

En considérant que l'absorption cellulosique est nulle, le Rf de chaque substance dépend :

1. du coefficient de partage de cette substance entre l'eau et le solvant ;
2. du volume d'eau retenu par unité de surface du papier ;
3. du volume du solvant saturé d'eau par unité de surface de papier irrigué par ce solvant ;
4. des éléments qui accompagnent la substance.

Les conditions 2 et 3 peuvent être considérées comme constantes ; mais il faut envisager des précautions thermiques, dont nous parlerons plus tard.

2. TECHNIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Appareillage :

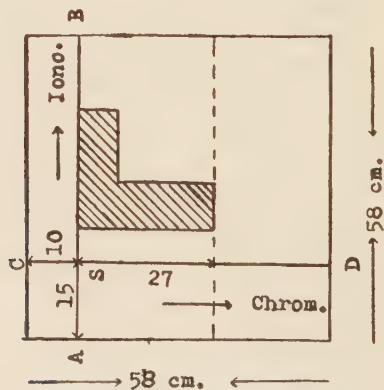
L'appareillage est très simple. Il comprend un récipient cylindrique ou rectangulaire qui est pratiquement

¹) Voir « Chromatography » de LEDERER et l'exposé de BOU LANGER.

clos à toutes pénétrations ou échappement de gaz. Ces chambres étanches sont souvent fabriquées en verre.

Pour le choix des chambres étanches, nous recommandons de prendre le minimum de volume, ce qui permet une saturation rapide du milieu et une économie très appréciable de temps et de matériel. On voit souvent des chambres chromatographiques de grande dimension, fabriquées en verre avec un pourtour en bois. Cette combinaison nous a donné de grands soucis : tout d'abord, en raison d'une saturation non parfaite de la chambre, d'où augmentation du temps nécessaire à la chromatographie (48 h. pour une progression de 40 cm.) ; ensuite l'utilisation de quantités importants du solvant, et pour finir, l'absorption du solvant par le bois qui rend inutilisable, pendant quelque temps, la cuve avec un autre solvant.

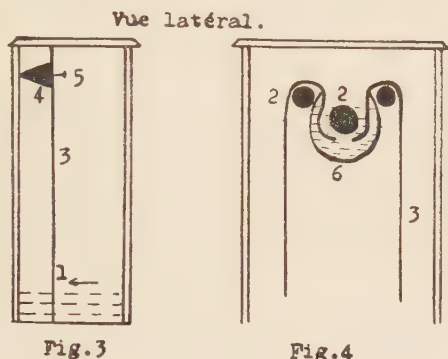
Ces genres de chambres chromatographiques ont une grande utilité lorsqu'il faut constamment travailler avec un seul solvant et de grandes feuilles. Pour nos petits chromatogrammes, nous avons utilisé des cuves rectangulaires de $30 \times 6 \times 14$ cm. Les dispositifs de l'appareillage sont présentés à la fig. 3. Dans chaque cuve on peut



SCHEMA pour la page 33

chromatographier deux bandes. Toutes conditions étant égales, les chromatogrammes sont parfaitement reproductibles d'une cuve à l'autre. Pour les grands travaux, tels que la *détermination* et le *dosage* des acides aminés,

nous avons employé la chromatographie bidimensionnelle descendante (fig. 4), dans les cuves ($50 \times 50 \times 20$ cm)



- | | |
|--------------------|----------------|
| 1 = Spot | 4 = Liège |
| 2 = Barre de verre | 5 = Épingle |
| 3 = Papier | 6 = Réci.solv. |

FIG. 4

en verre. Il va de soi que l'on pouvait aussi pratiquer la chromatographie ascendante ; mais notre dispositif favorise plutôt la chromatographie descendante.

Le papier :

Le papier chromatographique est un papier filtre plus ou moins épais selon la fabrication. Il existe actuellement plusieurs sortes de papier sur le marché, parmi lesquels on peut citer Whatmann N° 1 et 2 et 4, ainsi que Whatmann Accelerator qui est plus épais, mais plus fragile que ces derniers ; il y a également le papier français dit Durieux N° 111 et 122. Les Suédois chromatographient souvent avec Munktell OA ou OB.

SCHLEICHER et SCHÜLL fabriquent plusieurs sortes de papier connus sous le nom de SS qui trouvent une large utilisation partout, en particulier en Suisse. Nous avons choisi le papier SS 2043 B pour tous nos travaux chromatographiques. Ce papier a une épaisseur moyenne, une excellente résistance et fournit de bonnes séparations. La différence entre les papiers réside généralement dans leur épaisseur et leur pourcentage en eau. Il faut signaler que chaque papier a un sens de fabrication, généralement

dans le sens de la longueur ; il est donc préférable de chromatographier toujours dans le même sens. En outre, les papiers sont plus ou moins imprégnés d'impuretés dont il faut les débarrasser en cas de nécessité par des lavages (eau et acide).

Le procédé de lavage est choisi selon le besoin et le cas des impuretés. Pour la chromatographie des acides aminés il est préférable d'utiliser un papier lavé avec une solution d'eau-acide acétique 5 %. La solution est conduite comme dans une simple chromatographie jusqu'à la fin du papier, ensuite il faut sécher le papier.

Solvants :

Il y a actuellement un grand nombre de solvants utilisés pour la chromatographie. Pour la fabrication d'un solvant, on cherche parfois à établir des relations d'ordre physique entre ses composants. En principe, un solvant est praticable pour la chromatographie lorsqu'il est en solution homogène monophasée et miscible à l'eau. Le choix des solvants étant dicté par la nature des substances recherchées, voici les solvants retenus par nous pour la détection des acides aminés :

1. — A UTILISATION IMMEDIATE :

n. Butanol : 5 ; Acide formique 90 % : 2.

Temps de chromatographie = 7 h.

Ce solvant a été utilisé dans toutes les expériences de chromatographie monodimensionnelle (auto-digestion).

2. — PARTRIDGE :

n. Butanol : 4 ; Eau : 5 ; Acide acétique : 1.

Temps de chromatographie = 15 h. pour la chromatographie bidimensionnelle et 20 h. pour la chromatographie ionophorèse. On agite ce mélange dans une ampoule à décanter et on garde la phase supérieure pendant une semaine avant de l'utiliser. Il est prudent de limiter la date de l'utilisation à trois semaines. Ce solvant a été utilisé comme le solvant de la première direction. Pour la deuxième, nous avons utilisé :

3. — LEWY II :

Phénol 25 gr. (Redistilé par la méthode DRAPER-POLARD).

Crésol 25 gr.

Tampon Borate 7 gr. (PH = 9,28).

Cette solution est conservée au froid et à l'obscurité.

Temps de la chromatographie = 15 h.

Réactifs :

Après le séchage du papier à une température d'environ 45°, les substances sont révélées par les réactions colorées. Ces réactions doivent être spécifiques de la substance envisagée. Les réactions colorées ne sont pas les seuls moyens de révélation. En biochimie on pratique la méthode dite : RADIOPAPYROGRAMME et RADIO-AUTOGRAPHE qui consiste, respectivement, à déterminer l'emplacement d'une substance radioactive par le compteur de Geiger, et à radiographier un chromatogramme.

L'application des réactions biologiques sur les chromatogrammes ont aussi une très large utilisation pour la recherche des substances telles que les vitamines B₆ et B₁₂ (zone de croissance).

Nous avons réuni ici, comme pour les solvants, les réactifs utilisés dans nos travaux.

1. — *La lumière U.V. :*

Pour les substances fluorescentes des latex chromatographiés.

2. — *Ninhydrine :*

Solutions de 0,5 gr. % dans n. Butanol. Pour la révélation des acides aminés dans la chromatographie monodimensionnelle.

3. — *Ninhydrine-acide acétique :*

Butanol secon 222 V.

Eau 25 V.

CH₃COOH glacial 25 V.

Ninhydrine pure 1 gr. (à dissoudre dans le Butanol)
Pour la recherche des acides aminés dans les chromatogrammes bidimensionnels.

4. — *Ninhydrine pour le dosage quantitatif des acides aminés :*

Ninhydrine pure 500 mg.

Hydrindantine 25 mg.

Méthyl éthyl allosolve 17,5 cc.

Tampon acétate 7,5 cc. (2,7 M)

Dissoudre la Ninhydrine et l'Hydrindantine dans du méthyl éthyl allosolve et ensuite ajouter le tampon acétate. Virage au rouge.

Les chromatogrammes sont alors arrosés par les solutions ninhydriniques et ensuite on les sèche à 100° pendant quelques minutes. Le colorant des taches est ensuite mesuré par colorimétrie.

Les tampons :

Il est indispensable, pour la bonne marche de la chromatographie, de choisir un pH optimum. Voici la liste de nos tampons.

1. — *Tampon Acétate :*

Pour 3 litres de solution, ajouter 1088 gr. d'acétate de sodium, 3H₂O. Agiter à chaud jusqu'à dissolution complète. Ajouter alors 200 cc. de CH₃COOH glacial et compléter à 3 litres d'eau distillée.

2. — *Tampon borate pH = 9,28.*

200 cc. 0,1 Mol BO 3 H₃ (1236 mg.)

113,5 cc. 0,1 » NaOH (454 »)

3. — *Tampon pH = 2,1. Pour Ionophorèse :*

Acide acétique glacial 240 cc.

Acide formique 184 cc.

Eau distillée 7576 cc.

Mesure du Rf :

La fin du parcours du solvant est généralement bien marquée, même après le séchage du papier. Mais il vaut mieux l'indiquer par une petite incision. Pour la mesure du Rf, on part du centre du spot initial marqué préalablement par un petit trou d'épingle. Pour les déplacements des spots dans la chromatographie bidimensionnelle, il faut consulter des chromatogrammes standard faits avec le même solvant, ce qui permet de donner un rapide diagnostic. Il faut noter que les positions des substances sur le chromatogramme, les unes par rapport aux autres, sont importantes pour un diagnostic exact.

3. LES PRECAUTIONS QU'IL FAUT PRENDRE LORS DE LA CHROMATOGRAPHIE

Malgré la simplicité que présente cette méthode, il faut tenir compte des points suivants :

1. A titre de comparaison, il faut chromatographier dans des cuves de mêmes dimensions et avec le même volume de solvant (toujours en excès).
2. Sécher le papier toujours verticalement ou horizontalement.
3. Le dépôt de la solution à analyser doit être toujours à une hauteur identique.
4. Le solvant ou les mélanges des solvants doivent être très purs. Les différences de Rf que l'on remarque pour une seule matière sont généralement dues à une mauvaise préparation et à l'impureté du solvant.
5. Pendant la chromatographie avec un solvant oxydable par l'air et la lumière, il faut pratiquer dans une chambre noire.

6. L'influence de la température est particulièrement bien marquée sur les Rf. Les auteurs sont d'accord qu'une différence de température de plus de 5 degrés est dangereuse pour la chromatographie. En augmentant la température, il y a des solvants qui s'enrichissent en eau (Phénol) et d'autres qui s'appauvrissent (travaux de ALCOOK et CANNELL). Cette constatation est très importante dans la chromatographie parce que M. CHOLLET montre que le Rf. varie dans le sens de la teneur en eau du solvant. A température identique (18°), le Rf. du glucose est 2,4 fois supérieur, quand la teneur en eau du solvant (Butanol/a. acétique/eau) augmente de « très peu » à 24 %. Pour le premier cas, le Rf. est 0,08, et pour le second 0,19. Il faut donc respecter une stabilité thermique. Tous nos travaux se sont déroulés à une température de $20 \pm 2^\circ$.
7. Parmi les réactifs il y a ceux qui sont fugaces, comme la ninhydrine et les réactifs iodés. Il faut donc indiquer l'emplacement des spots après la révélation.

4. IONOPHORESE

Pour la recherche des acides aminés dans les deux latex d'*Euphorbia cyparissias* L. et *Chelidonium majus* L., nous avons eu recours à la ionophorèse.

Voici les conditions techniques que nous avons employées :

Le récipient est une grande cuve remplie de toluol. La cuve est munie d'une anode qui est placée à la partie supérieure, et de deux cathodes qui sont placées à la base de la cuve. L'élimination de la chaleur dégagée par le passage du courant électrique se fait par un système de réfrigérateur de courant d'eau qui est posé à l'intérieur de la cuve.

Les papiers, longs de 58 cm et larges de 27 cm, sont plongés dans le toluol qui sert à la fois de milieu isolateur et d'aide à la réfrigération.

Voltage : 1.800 V.

Durée de l'opération : 110 à 120 minutes.

Ampérage : 50 à 107 selon la quantité de feuilles déposées.

Dans notre cuve, il y avait la possibilité de faire la ionophorèse pour 6 feuilles.

Papier : SS 2043 B glacé.

Tampon : pH 2.

Réactif pour la révélation : toujours Ninhydrine.

Voici comment on procède à la chromato-ionophorèse :

Le spot est déposé sur le papier SS 2043 B glacé de 58×58 cm à l'endroit indiqué par le schéma. On pratique une chromatographie de 19 à 20 heures avec le solvant de Partridge dans le sens du papier (DIRECTION C.D.). Après ce temps, les acides aminés sont amenés jusqu'au 27^e centimètre du spot. On sèche le papier à 40 degrés, pendant une heure ; ensuite on tamponne le papier séché avec le tampon pH 2, 1, puis on procède à l'opération ionophorèse avec ce papier coupé qui a désormais la dimension de 27×58 cm.

Généralement, après 110 minutes, les acides aminés sont emportés à environ 30 cm de la ligne de démarcation. Avec cette technique, les acides aminés basiques émigrent plus rapidement et se placent en tête en suivant la ligne AB du papier. Sur le schéma, la surface hachurée indique l'emplacement de l'ensemble des acides aminés après la ionophorèse.

Dans les conditions mentionnées ci-dessus, nous abrégeons de plusieurs heures la durée de l'analyse et nous obtenons une meilleure séparation d'acides aminés.

5. Technique de l'hydrolyse acide :

Le latex destiné à être hydrolysé est dissous dans l'acide chlorhydrique 5,7 N à raison de 1 microlitre pour chaque gamma d'acide aminé. Ensuite on enferme cette solution dans des tubes capillaires, pour être abandonnée pendant 18 heures dans un bain sec ou dans un bain d'huile à 110°.

III. — PARTIE EXPERIMENTALE

EFFET DE LA MALADIE DE LA ROUILLE
SUR LE SPECTRE DES ACIDES AMINES DU LATEX
D'EUPHORBIA CYPARISSIAS L.

Introduction :

La rouille des *Euphorbia cyparissias* L. est due à plusieurs espèces et races d'Uredinées hétéroiques, dont la plus classique est l'*Uromyces pisi* (Pers.) De By. Le parasitisme détermine, dans le cas de cette dernière espèce, un allongement de la tige et une castration. Si l'infection est due à l'*Uromyces striatus* Schr., la plante hôte est nanisée et castrée. Trois autres espèces, moins importantes, peuvent encore provoquer l'état d'*aecidium* chez *Euphorbia cyparissias* L.

Nos récoltes concernent essentiellement des euphorbes parasitées par *Uromyces pisi* (Pers) De By ; il n'est pas impossible qu'ils s'y soient mêlés des individus dont la rouille était due à d'autres espèces. Cette contamination ne saurait être que faible ! Nous devons toutefois cet aveu aux mycologues, qui savent presque mieux que les physiologistes, le rôle de l'espèce dans les altérations du métalolisme de la plante attaquée.

Uromyces pisi (Pers) De By cause à l'euphorbe des dégâts appréciables : les tiges chez les plantes malades sont grêles, allongées et non ramifiées ; les feuilles sont jaune pâle, de forme plane ou en cuillère, beaucoup plus courtes que les feuilles normales, mais plus larges et plus turgescentes ; les parenchymes en sont durs et cassants. Elles tombent prématurément. La plante est souvent stérile par castration florale. Les symptômes de la maladie apparaissent seulement dans la seconde année d'in-

fection. Nous observons que, très souvent, le latex des plantes malades devient plus hyalin et moins abondant que chez les plantes saines*.

Matériel et techniques

Le but premier de ces essais (voir Introduction) fut de comparer par la méthode chromatographique les latex d'euphorbes saines et parasitées. Cette tentative, fruste au début, nous a obligé à développer les techniques nécessaires à sa réalisation. La partie II de notre mémoire résume ces données techniques. Diverses observations faites au cours des mesures nous ont conduit à préciser certaines caractéristiques du latex ; en particulier les fluctuations rapides de son spectre d'acides aminés (expériences sur la dégradation) et les modifications saisonnières de ce spectre.

Concentrons tout d'abord notre attention sur les effets du parasitisme sur le spectre des acides aminés du latex. Voici les conditions dans lesquelles furent faites les expériences de ce chapitre : la chromatographie circulaire, adoptée en 1955, fut remplacée en 1956 et 1957 par la chromatographie bidimensionnelle. A partir de 1958 nous utilisons la chromato-ionophorèse ; seuls les résultats obtenus avec ce procédé figurent ici.

Nous récoltons directement le latex frais des tiges, écoulé librement sur le papier SS 2043 B glacé de 58×58 cm. Avant de poser les gouttes suivantes, les premières sont séchées à l'air chaud. La surface du spot obtenu ne dépasse pas $0,8 \text{ cm}^2$. Cinq tiges, coupées une

* Pour les études plus complètes nous renvoyons les lecteurs aux ouvrages spécialisés, en particulier ceux de G. VIENNOT-BOURGIN : « Les champignons parasités des plantes cultivées » (Masson et Cie), tome 2, p. 972, et de A.-L. GUYOT : « Les urédinées » (P. Lechevalier, éd.), 1948.

fois transversalement, sont suffisantes pour préparer un spot de latex sain. Pour les sujets malades, le latex est moins abondant et s'écoule difficilement. Il faut donc utiliser 15 tiges pour récolter à peu près la même quantité que dans le cas précédent. Nous chromatographions immédiatement ces deux papiers ensemble dans une grande cuve de verre, avec le solvant Partridge, dans le sens du papier.

Après 19 à 20 heures, le solvant est conduit à la base du papier (58 cm). Nos expériences nous montrent que les acides aminés, dans ces conditions, ne seront pas amenés au-delà du 27e cm du spot. Nous coupons, après les avoir séchées, les parties inutiles, pour avoir la nouvelle dimension de 27×58 cm.

Nous procédons ensuite, sur ce nouveau format du papier, à notre ionophorèse habituelle des acides aminés :

Le papier sera humecté avec le tampon $\text{pH} = 2,1$ (voir la partie technique) et sera porté à la cuve de ionophorèse pendant 110 à 120 minutes à un voltage de 1800 V.

Normalement, pour deux feuilles de papier SS 2043 B glacé de 27×58 , l'ampérage atteint est de 50 mA.

La révélation se fait par la solution de ninhydrine acétique (voir partie technique).

Chacune de ces expériences est doublée d'un essai opéré sur un latex hydrolysé. Il s'agit, en effet, d'éliminer certaines taches attribuables à des polypeptides et, d'autre part, d'enregistrer les produits de l'hydrolyse de protéides éventuels. Le latex, destiné à l'hydrolyse, doit être débarrassé autant que faire se peut des polyterpènes (3,64 % de caoutchouc dans le latex d'*Euphorbia cyparissias* L. selon WEISS et WIESNER) qui se coagulent et se carbonisent partiellement au cours du chauffage

nécessité par cette opération. Ces amas peuvent constituer des trappes où sont retenus, en partie, les acides aminés. Le dégraissage le meilleur est obtenu en émulsionnant le latex dans l'éther de pétrole (agitateur). L'émulsion est coupée par de l'eau : l'épiphase pétroléique, trouble, est jetée. L'hypophase aqueuse est concentrée à la température ordinaire sous le vide. Le résidu sec est pesé. Ce résidu sera repris par une solution HCl, N 5,7 à raison de un ml. d'acide par gamma d'acides aminés. Cette détermination de la teneur en acides aminés du résidu est permise par des opérations préalables, au cours desquelles on a estimé, colorimétriquement, les acides aminés présents dans les taches chromatographiques.

La solution acide est portée à 110° pendant 18 heures (à sec). Après refroidissement, la liqueur acide est évaporée sous le vide. Le résidu ou hydrolysât sera repris dans une petite quantité d'eau pour préparer un seul spot. Des précautions ont donc été prises pour rendre aussi comparables que possible les spots de latex frais et de latex hydrolysé.

Suivant nos calculs, 8 mg de latex dégraissé et déshydraté sont suffisants pour effectuer une chromatophorèse.

Nous pouvons maintenant grouper les expériences du 8-5-1958 selon le schéma suivant :

du latex sain	→ Avant l'hydrolyse	= figure 5
↑	→ Après l'hydrolyse	= figure 6
Acides aminés		
↓	→ Avant l'hydrolyse	= figure 7
du latex malade	→ Après l'hydrolyse	= figure 8

Résultats chromatographiques

Figure 5. — Chromato-ionogramme du latex frais de l'*Euphorbia cyparissias* L. saine.

Cinq acides aminés :

- Aspartique.
- Thréonine.
- Sérine.
- Arginine.
- Phénylalanine.

On remarque également sept taches ninhydrine positive qui peuvent être des polypeptides à courte chaîne.

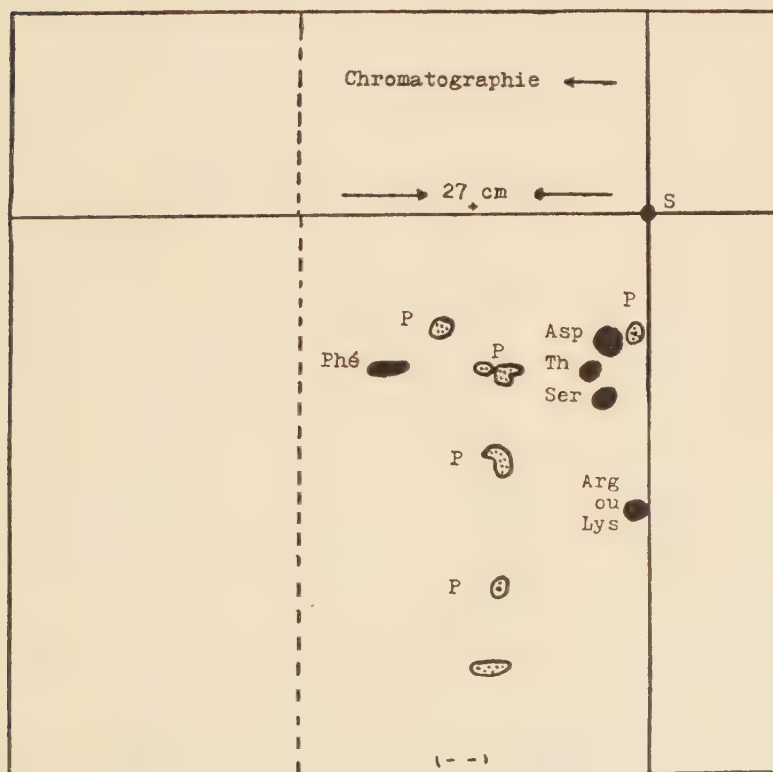


FIG. 5

Figure 6. — Chromato-ionogramme du latex dégraissé et hydrolysé de l'*Euphorbia cyparissias* L. saine.

Treize acides aminés :

— Aspartique.	— Proline.	— Lysine.
— Glutamique.	— Alanine.	— Tyrosine.
— Thréonine.	— Glycine.	— Phénylalanine.
— Sérine.	— Arginine.	— Valine.
		— Leucine.

Malgré l'hydrolyse théoriquement complète que cette solution a subie nous remarquons ici aussi huit autres taches ninhydrine positive qui peuvent être très probablement des polypeptides à courte chaîne.

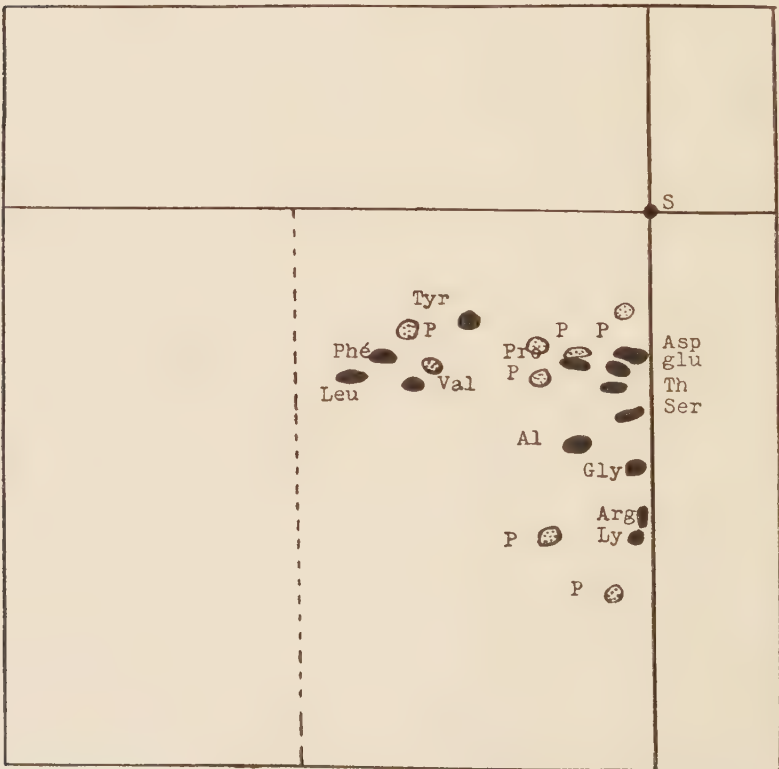


FIG. 6

Figure 7. — Chromato-ionogramme du latex frais de l'*Euphorbia cyparissias* L. parasitée et castrée par *Uromyces pisi* (Pers.) De By.

Pas d'acides aminés libres.

Souvent des taches polypeptidiques comme dans le cas de cette expérience.

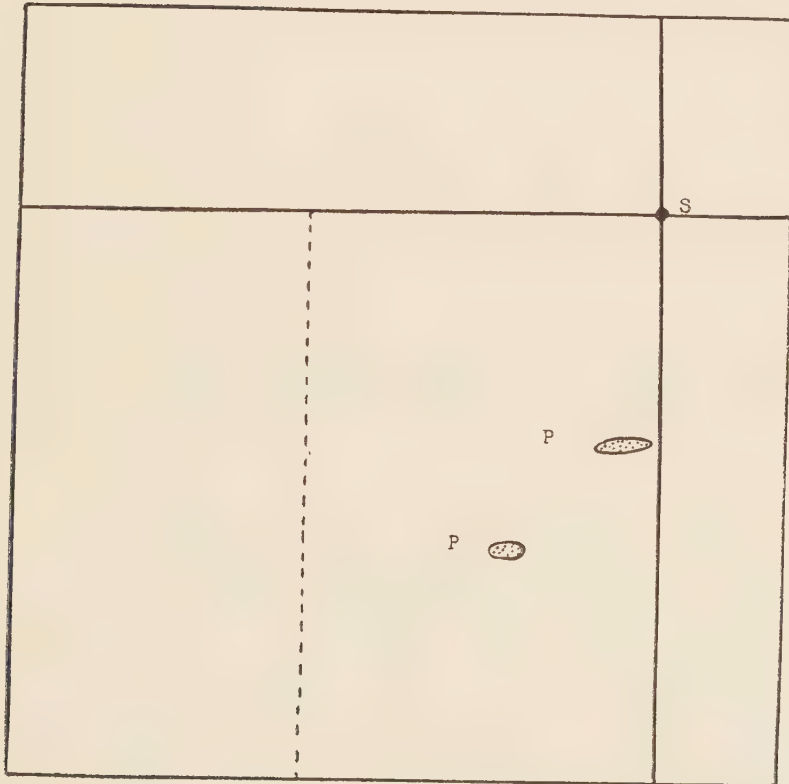


FIG. 7

Figure 8. — Chromato-ionogramme du latex dégraissé et hydrolysé de l'*Euphorbia cyparissias* L. parasitée et castrée par l'*Uromyces pisi* (Pers.) De By.

Treize acides aminés (les mêmes que pour la figure 6) :

— Aspartique.	— Proline.	— Lysine.
— Glutamique.	— Alanine.	— Tyrosine.
— Thréonine.	— Glycine.	— Phénylalanine.
— Sérine.	— Arginine.	— Valine.
		— Leucine.

Dans ce tableau, nous remarquons que la disposition des plages polypeptidiques ne sont pas les mêmes que dans la figure 5. Ici nous comptons un nombre plus élevé (17) de taches ninhydrine positive non acides aminés connus.

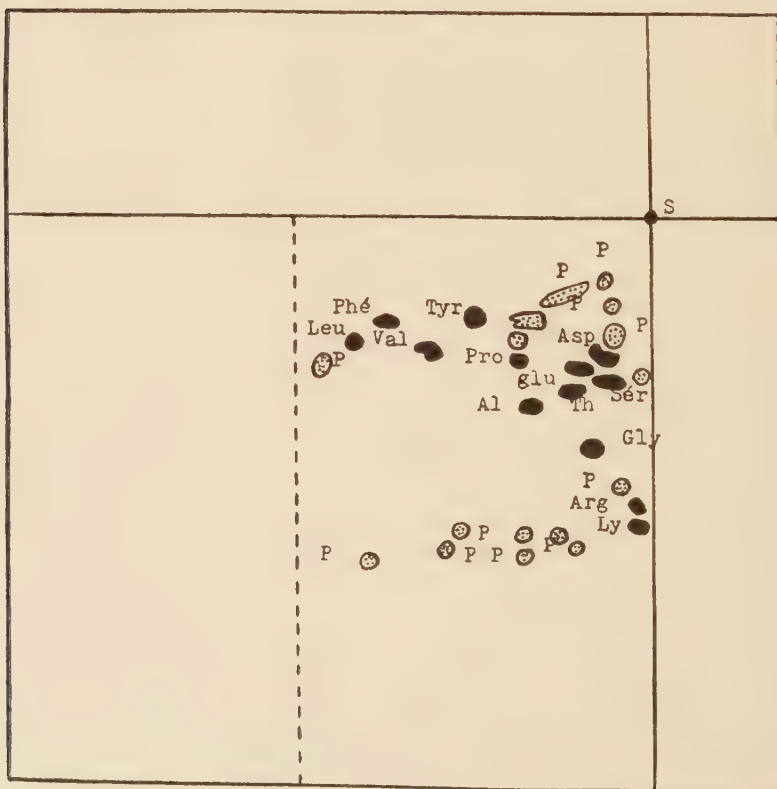


FIG. 3

Conclusions

Les unes concernent la composition du latex :

1) La chromatographie révèle, dans le latex de la plante saine, cinq acides aminés : l'acide aspartique, la thréonine, la sérine, l'arginine et la phénylalanine.

2) Ces acides aminés appartiennent à la catégorie des acides aminés entrant dans la constitution des protéines (voir liste dans composition du latex).

3) L'hydrolyse du latex de la plante saine révèle la présence de substances protéiques. Cette démonstration, par un procédé nouveau, confirme les données déjà anciennes de la littérature à ce sujet (voir composition du latex, et figures 6 et 8).

4) Dans la chromatographie du latex frais, à côté des taches ninhydrine positive dont la position est nettement caractéristique de celle d'un acide aminé connu, on trouve encore un certain nombre d'autres taches ninhydrine positive correspondant à des polypeptides à courtes chaînes.

Les autres sont relatives aux effets du parasitisme :

5) Tous les acides aminés libres disparaissent dans le latex de la plante malade (rouillée). Ce résultat dérive de trois expériences faites à trois printemps successifs (figures 5 et 7).

6) Les deux latex, sain et malade, possèdent, à l'échelle de notre analyse, les mêmes éléments protéiques. Le nombre et la qualité des acides aminés obtenus par l'hydrolyse acide sont les mêmes dans les deux cas (figures 6 et 8). Le parasitisme ne semble pas avoir modifié visiblement les protéines et les polypeptides du latex.

7) Parfois, le latex malade accuse aussi la présence de polypeptides à courtes chaînes : taches ninhydrine positive non attribuable à des acides aminés.

Au point de vue biologique, le fait essentiel est celui de la disparition des acides aminés dans le latex des plantes malades.

Plusieurs suppositions peuvent être faites à ce sujet : la plus probable est que le champignon consomme les acides aminés libres. On peut encore envisager, bien qu'avec moins de probabilité, soit une destruction enzymatique des acides aminés (amino-oxydases), soit une condensation de ces molécules en polypeptides et protéines.

Nous reviendrons, à propos du latex de *Chelidonium majus* L., à cette question de disparition des acides aminés, réalisés alors dans des conditions toutes différentes.

La distribution des acides aminés dans le latex d'*Euphorbia cyparissias* L. saine et malade (rouillée) :

ACIDES AMINES	ETAT PHYSIOLOGIQUE			
	Sain		Rouillé	
	Libres	Protides	Libres	Protides
Alanine	—	(+) ¹⁾	—	(+)
Arginine	+	+	—	(+)
Aspartique	+	+	—	(+)
Glycine	—	(+)	—	(+)
Glutamique	—	(+)	—	(+)
Leucine	—	(+)	—	(+)
Lysine	—	(+)	—	(+)
Phénylalanine	+	+	—	(+)
Proline	—	(+)	—	(+)
Sérine	+	+	—	(+)
Thréonine	+	+	—	(+)
Tyrosine	—	(+)	—	(+)
Valine	—	(+)	—	(+)

¹⁾ (+) = origine purement protidique (issu de l'hydrolyse).

Remarque : le terme protides, inscrit au haut de la colonne, signifie exactement : acides aminés ne surgissant qu'après l'hydrolyse des protides du latex.

II

INFLUENCE DE LA SAISON SUR LE SPECTRE DES ACIDES AMINÉS DU LATEX DE *CHELIDONIUM MAJUS* L.

Introduction

A côté des euphorbes, nous avons expérimenté sur le *Chelidonium majus* L., plante très répandue dans nos contrées. Ce végétal présente, pour le physiologiste, divers avantages : son latex coloré est abondant tant dans les tiges que dans les racines. La végétation s'étend enfin sur presque toute l'année. La tradition populaire reconnaît enfin des vertus cytolytiques à ce latex communément employé contre les verrues.

En renouvelant nos observations physiologiques du latex, nous avons remarqué des anomalies dans le spectre des acides aminés du latex de chélidoine. Ces anomalies se caractérisent par une augmentation des corps azotés au début du printemps, et une diminution de ces corps après la fructification de la plante.

Cette observation est importante pour expliquer deux phénomènes obscurs de la physiologie végétale :

1° Le rôle du latex dans l'économie végétale.

2° L'importance de l'azote dans la floraison.

Cette expérience nous montre que le latex est l'objet de grandes variations qualitatives, selon le métabolisme de la plante. Elle montre ensuite que, pour les besoins de la floraison, la plante exige entre autre une mobilisation et une distribution accusées des corps azotés, en particulier des acides aminés et des polypeptides.

Voici maintenant l'illustration de cette expérience à l'aide de la chromatographie sur papier.

Matériel et techniques

a) *Préparation du latex*. — La quantité nécessaire de latex pour l'expérience est tout d'abord recueillie dans l'eau distillée. Ici, comme toujours, nous utilisons le latex des tiges qui sort de la blessure librement et sans pression. Le latex dilué, ainsi obtenu, est chauffé à 100° pendant 8 minutes pour inactiver les enzymes qui s'y trouvent en abondance. Dans l'espace d'une heure environ, nous récoltons généralement 400 à 500 mg de latex, ce qui est d'ailleurs suffisant pour plusieurs chromatographies. Après le chauffage, la solution est centrifugée dans une centrifugeuse à 40.000 tours, pendant 30 minutes. Après cette opération, nous lyophilisons le liquide surnageant ; ces deux opérations nous permettent de constater que ce latex contient environ 84,5 % d'eau (mois d'octobre).

Le latex lyophilisé est une poudre jaune cuivre d'une saveur extrêmement amère, qui est très hygroscopique (le chauffage à 100° pendant 8 minutes change la couleur jaune du latex qui passe au jaune cuivre).

Le latex en poudre est prêt à être employé, soit sous forme d'une solution aqueuse, soit après l'hydrolyse acide. Au cours d'une série d'expériences, nous récoltons suffisamment de latex et nous le gardons sous forme de poudre lyophilisée dans des capsules de verre hermétiquement fermées.

Les plantes de deux saisons d'expériences ont été récoltées en une même station. Nous utilisons 6 mg de latex (poids sec) pour faire une chromatographie.

b) *Chromato-ionophorèse* (figures 9 et 10). — Le mode d'opération de cette méthode, que nous avons employée pour la recherche des acides aminés avant la floraison, est exactement le même que dans l'expérience précédente (spectre d'acides aminés du latex d'*Euphorbia cyparissias* L.). Nous chromatographions donc avec le solvant de Partridge dans la première direction, et pour la seconde direction nous employons la ionophorèse.

c) *Chromatographie bidimensionnelle* (figures 11 et 12). — *Les solvants* : 1re direction : Partridge ; 2e direction : Lewy II.

Entre ces deux opérations, on sèche le papier à 40° pour le tamponner ensuite avec le tampon Borate (pH 9,28) au moyen d'un vaporisateur. On utilise le solvant de la deuxième direction après avoir séché à nouveau le papier. La ligne de parcours du spot due au passage du solvant Partridge est protégée au moment de la vaporisation du tampon par une lame de verre.

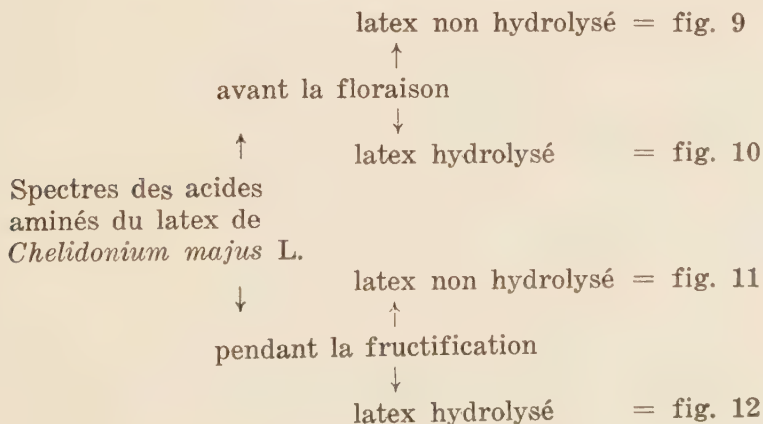
La durée de l'opération pour chaque solvant est de 15 heures.

Les solvants seront conduits jusqu'au sommet du papier.

Nous avons utilisé le papier SS 2043 B lavé (dimensions 36 × 38). Le spot est déposé sur l'angle droit qui est formé par les deux lignes tracées sur le papier à 8 cm de distance des deux bords de la feuille.

Il faut noter que ces deux manières de procéder (chromato-ionographie et chromatographie bidimensionnelle) fournissent les mêmes résultats pratiques ; la valeur des expériences reste identique.

Nous pouvons diviser notre expérience de la façon suivante :



Résultats avant la floraison

Figure 9 : Elle schématise le chromato-ionogramme du latex chauffé et lyophilisé de *Chelidonium majus* L. avant la floraison.

Date de la récolte : 7 mai 1958.

On trouve deux catégories d'éléments :

1° Les corps azotés :

a) Les acides aminés : Les acides aminés figurant dans ce latex sont :

— Aspartique.	— Glutamique.	— Sérine.
— Proline.	— Glycine.	— Arginine.
— Lysine.	— Phénylalanine.	— Valine.

b) Les polypeptides : En dehors de ces acides aminés, nous remarquons plusieurs autres taches ninhydrine positive.

Elles peuvent être en principe soit des polypeptides, soit des amines.

L'hydrolyse de ce latex nous amène à connaître la nature exacte de ces taches. Celles qui ne disparaissent pas après l'hydrolyse ne sont très probablement pas des polypeptides.

Nous désignons ces taches non acides aminés, non polypeptidiques, résistant à l'hydrolyse, par la lettre (a).

Au centre de ce chromato-ionogramme, il y a une plage constituée de trois parties, qui réagit avec la ninhydrine en présentant d'une part une vive couleur jaune et, d'autre part, une couleur orange. L'hydrolyse nous montre qu'il s'agit d'un polypeptide riche en proline. (Nous verrons de même dans la figure 11). En effet, après l'hydrolyse, l'intensité et la grandeur de la proline augmentent beaucoup.

Le nombre des taches polypeptidiques, dans le cas de cette expérience, s'élève à 16. Nous comptons aussi quatre autres taches dans les catégories de (a).

2° Les pigments :

La masse des pigments emportée par le solvant Partridge sur la ligne de parcours, subit l'effet du passage du courant électrique et va vers la cathode.

Certains pigments occupent une grande plage jaune sur le ionogramme et possèdent 5 pics, représentant 5 matières chimiquement et quantitativement différentes. Dans la plage jaune, on remarque en plus deux taches, rouge et orange. Près de la plage, nous comptons, en outre, 3 autres éléments pigmentaires qui se superposent aux pics 4 et 5. Il existe encore une autre tache pigmentaire jaune qui migre plus loin que les autres ; elle est placée près de la glycine.

Le nombre des pigments qui constituent la couleur jaune orange de ce latex s'élève donc à 11.

Ces 11 pigments sont fortement fluorescents et ont une charge positive.

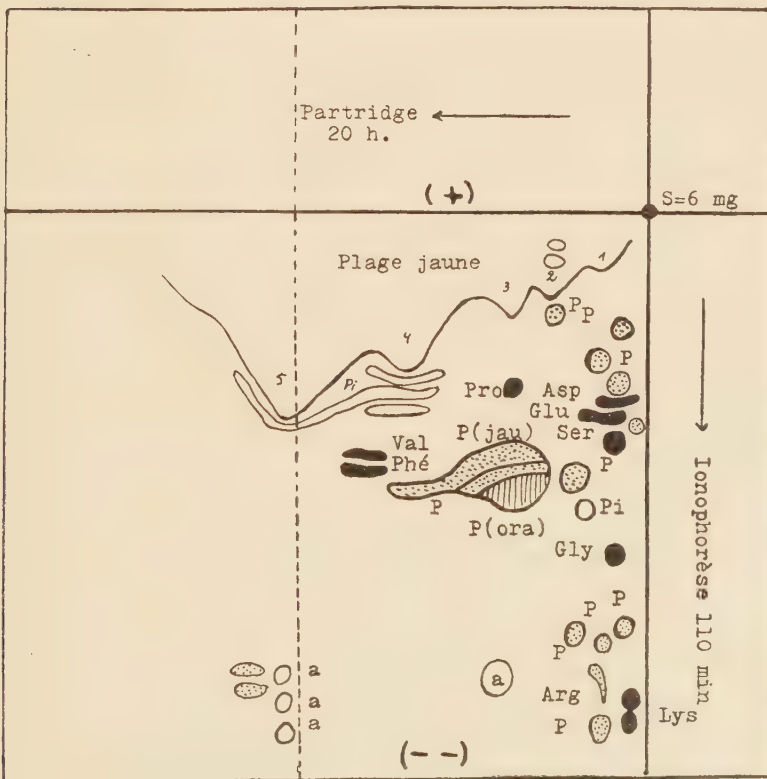


FIG. 9

Figure 10. — Elle présente le chromato-ionogramme du latex chauffé, lyophilisé et hydrolysé (ClH) de *Che-
lidonium majus* L. avant la floraison. Date de récolte :
7 mai 1958.

Ici aussi, nous divisons la lecture de cette figure en deux parties.

1° *Les corps azotés :*

Après l'hydrolyse, nous voyons apparaître deux acides aminés nouveaux (Leucine et Alanine) et la disparition des 16 taches polypeptidiques. L'intensité et la superficie des autres taches d'acides aminés ont augmenté par rapport à la figure 9.

Voici donc la liste des acides aminés de ce ionogramme (avant la floraison) :

— Aspartique.	— Glutamique.	— Sérine.
— Proline.	— Glycine.	— Arginine.
— Lysine.	— Phénylalanine.	— Valine.
— Leucine.	— Alanine.	

2° *Les pigments :*

L'hydrolyse agit également sur ces hétérosides qui se scindent en libérant les aglycones. La plage, constituée par les pigments, se déplace moins et l'intensité de ces éléments diminue à la lumière ordinaire et en U.V.

Les cinq pics n'ont plus la forme antérieure. Nous voyons apparaître sept nouvelles petites plages orangées qui sont le produit de l'hydrolyse des pigments.

La petite tache jaune, placée très en avant des autres, a complètement disparu.

(Figure 10 page suivante).

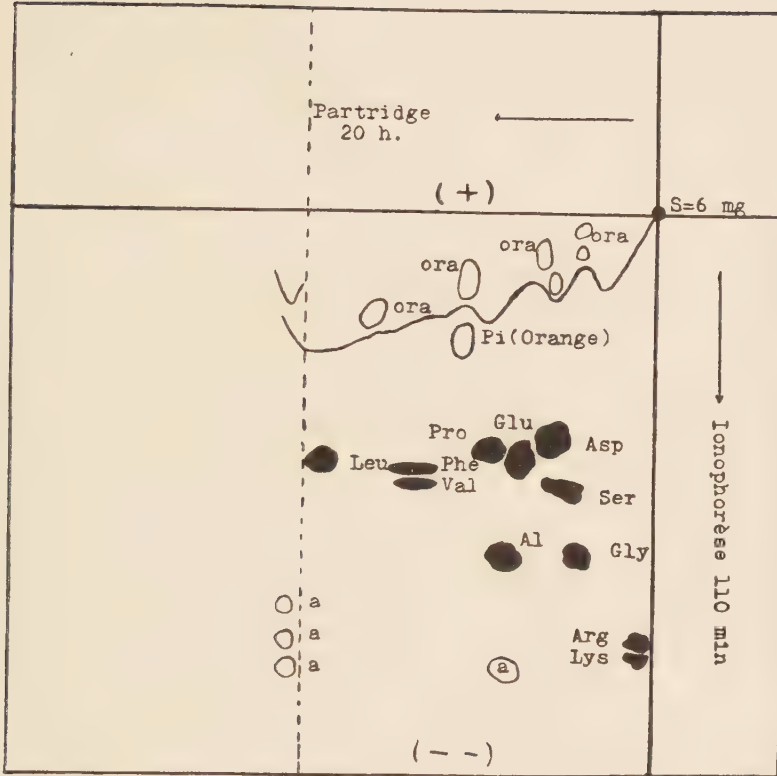


FIG. 10

Résultats pendant la fructification

Figure 11 : C'est le chromatogramme bidimensionnel du latex de *Chelidonium majus* L. pendant la fructification. Date de récolte : 10 octobre 1957.

Pour cette figure, ainsi que pour la figure 12, nous limitons la lecture aux corps azotés, étant donné que les pigments sont dénaturés lors du passage du solvant Lewy 2.

Voici la liste des acides aminés libres qui se trouvent dans ce latex à la période de l'après-floraison :

- | | |
|-----------------------|------------------|
| — Aspartique. | — Alanine. |
| — Arginine ou Lysine. | — Glycine. |
| — Glutamique. | — Phénylalanine. |

Il existe deux taches polypeptidiques, une très grande qui se colore en jaune avec la ninhydrine, et l'autre, petite et violette. Après l'hydrolyse acide, nous voyons que (fig. 12) ces deux taches disparaissent ; par contre, on constate l'apparition d'une grande quantité de proline, de thréonine et de sérine. Il est donc clair que la grande tache jaune est un polypeptide riche en proline.

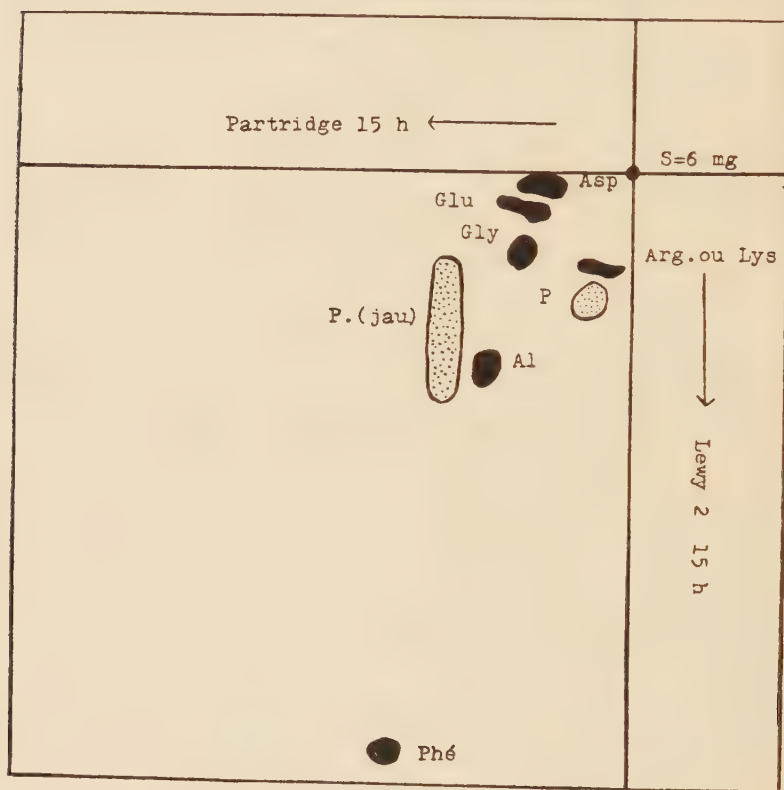


FIG. 11

Figure 12 : Elle représente le chromatogramme bi-dimensionnel du latex chauffé, lyophilisé et hydrolysé de *Chelidonium majus* L. après la fructification. Date de récolte : 10 octobre 1957.

Nous remarquons que l'intensité et la grandeur des taches augmentent considérablement par rapport à ce que l'on voit sur le chromatogramme du latex non hydro-

lysé. Par ailleurs, trois taches supplémentaires s'inscrivent : celles de la sérine, de la thréonine et de la proline. On peut donc conclure que les protéines et les polypeptides de ce latex ne sont pas constitués par d'autres acides aminés que les neuf acides aminés de la liste suivante :

- | | |
|-----------------------|------------------|
| — Aspartique. | — Glycine. |
| — Arginine ou Lysine. | — Thréonine. |
| — Sérine. | — Alanine. |
| — Glutamique. | — Proline. |
| | — Phénylalanine. |

Dans notre chromatogramme, il existe une tache violette, marquée par un (X), qui peut être un acide aminé inconnu ou un corps azoté répondant à la réaction de ninhydrine.

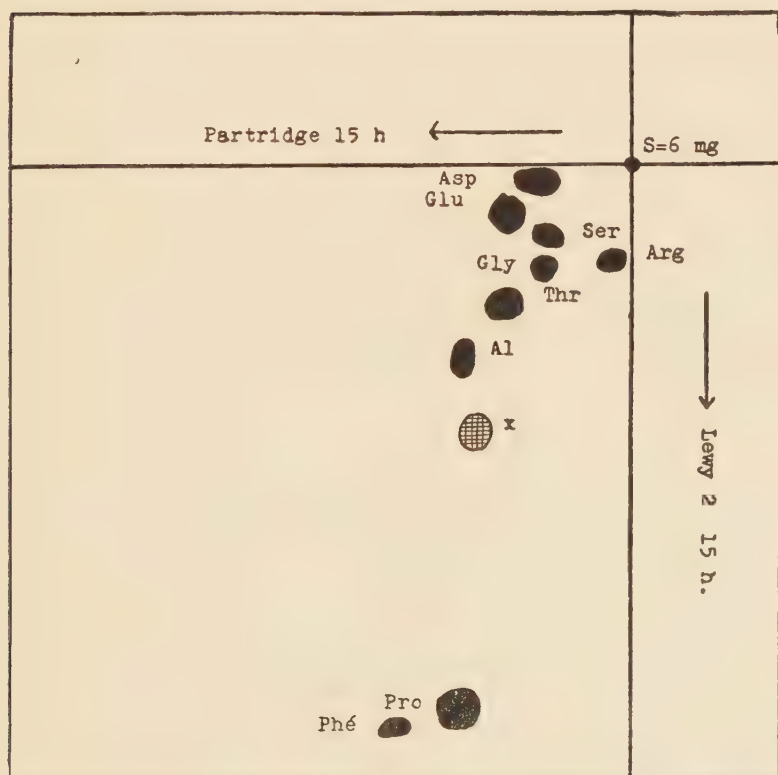


FIG. 12

Conclusions

Les conclusions que l'on peut tirer de cette expérience se divisent en deux parties :

a) *d'ordre chimique :*

1° Les figures 9 et 11 présentent respectivement les acides aminés libres du latex *Chelidonium majus* L. dans les périodes d'avant et d'après floraison.

2° Le pigment jaune orangé de ce latex est un corps composé de 11 éléments chromatiques au minimum.

Ces éléments sont sensibles à l'hydrolyse et ils se scindent en d'autres corps chromatiques plus simples. L'intensité de ces derniers est beaucoup moindre que celle des premiers.

b) *d'ordre physiologique :*

1° Nous référant toujours aux figures 9 et 11, nous remarquons que les acides aminés ainsi que les corps azotés ninhydrine positive du latex d'avant la floraison sont nettement plus grands que dans le latex de la période de fructification. Cette augmentation des corps azotés avant la floraison prouve l'importance de l'azote dans l'état de floraison.

2° La variation des éléments constitutifs du latex favorise l'idée que ce suc a une part active dans le métabolisme de la plante et possède des échanges constants avec d'autres systèmes de la plante.

La distribution des acides aminés dans le latex de chélidoine pour les périodes se situant :

1° avant la floraison ;

2° après la floraison.

ACIDES AMINES	PERIODE			
	Avant la floraison		Après la floraison	
	Libres	Protides	Libres	Protides
Alanine	—	(+) ¹⁾	+	+
Arginine	+	+	+	+
Aspartique	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+
Glutamique	+	+	+	+
Lysine	+	+	—	—
Leucine	—	(+)	—	—
Phénylalanine	+	+	+	+
Proline	+	+	—	(+)
Sérine	+	+	—	(+)
Thréonine	—	—	—	(+)
Valine	+	+	—	—

¹⁾ (+) = origine purement protidique (issu de l'hydrolyse).

Le latex de la période de l'après-floraison présente aussi une diminution considérable des taches polypeptiques.

III

DEGRADATION DES ACIDES AMINES DANS LE LATEX DE CHELIDONIUM MAJUS L.

1° Introduction

Au début de notre travail, la technique de stockage du latex n'était pas la lyophilisation. Nous récoltions le latex nécessaire pour une série d'expériences directement sur le papier destiné à être chromatographié plus tard.

C'est alors que nous avons remarqué que le latex d'une même plante et d'une même récolte, chromatographié à des temps différents, présentait des variations considérables dans les gammes d'acides aminés.

En effet, le latex déposé sur le papier et chromatographié deux ou trois jours plus tard accusait une diminution presque totale des taches ninhydrine positive.

Nous avons soupçonné que cette diminution des acides aminés était attribuable à une auto-dégradation due aux enzymes du latex. Pour déterminer le moment exact et l'importance de cette disparition, nous avons établi, après plusieurs recherches, cinq conditions expérimentales.

Dans les conditions de nos essais, les enzymes agissant sur les constituants du latex peuvent dériver soit du tissu de la chélidoine (enzymes propres au latex), soit de cellules microbiennes ou fongiques (infection). Il était donc essentiel de distinguer ces deux origines. A cet effet, nous avons combiné des opérations d'inactivation enzymatique par la chaleur (100°), de conservation à basse température (3°) et d'antiseptie (streptomycine).

Nous récoltons le latex des tiges d'une même plante dans l'eau distillée. Rappelons à nouveau que l'écoulement du latex se fait librement et que ni les laticifères ni les autres cellules du tissu ne sont soumises à des pressions. Le liquide soumis ultérieurement aux expériences est donc un latex dilué environ 200 fois. Voici les cinq conditions mentionnées plus haut :

LATEX DILUE

	témoin	chauffé	antiseptisé
Gardé à 20°	1	2	4
Gardé à 3°	—	3	5

La conservation du latex se fait dans des erlenmeyers bouchés soigneusement et durera quarante jours. Pendant ce temps, des prélèvements successifs sont opérés pour des essais chromatographiques.

Dans la condition 2 : les enzymes sont inactivés et les germes détruits par la chaleur. Une contamination tardive, due à l'ouverture répétée du flacon, n'est pas exclue, bien qu'un contrôle microscopique n'ait rien révélé. Par contre, la température de garde est favorable au développement du processus enzymatique.

Condition 3 : semblable à la condition 2, sauf pour ce qui est de la température défavorable au déroulement des activités enzymatiques et au développement des germes de contamination.

Condition 4 : les enzymes du latex sont épargnés et les germes de contamination éliminés par la streptomycine. La température de garde est propice aux actions enzymatiques.

Condition 5 : comparable à la quatrième, à la différence que la température de garde est défavorable au déroulement des opérations enzymatiques, comme au développement des germes.

Notons encore que les flacons conservés à 3° se trouvent à l'obscurité.

2° Contrôle chromatographique :

Nous adoptons pour notre contrôle la chromatographie monodimensionnelle ascendante, chaque 24 heures pendant 10 jours et chaque 10 jours pendant 40 jours.

La chromatographie s'effectue sur le papier SS 2043 B, coupé à l'aide d'une machine en bandes de 30×5 cm.

Le spot est déposé à 3 cm de la base du papier (fig. 1, partie technique).

Le solvant employé est : Butanol secondaire - acide formique (5:2) fraîchement préparé. La cuve de la chromatographie est un récipient en verre de $30 \times 6 \times 14$ cm.

Après 7 heures de chromatographie à 20° , le solvant parcourt la distance de 25 cm., ce qui est suffisant pour nous donner une bonne séparation d'acides aminés.

L'avantage de cette technique est sa rapidité et la place réduite qu'elle exige. Nos possibilités matérielles ne nous permettaient pas, en effet, de chromatographier par nos méthodes habituelles (méthode bidimensionnelle et chromato-ionophorèse) 10 spots chaque jour. Ce procédé rapide nous prive pourtant de l'identification individuelle de chaque acide aminé. Ces derniers sont groupés en 3 ou 4, parfois même en 5 bandes de taches ninhydrine positive, taches superposées qui se placent à mi-chemin entre le spot et les bandes de pigments. Celles-ci sont représentées par trois taches distinctes et diversement colorées : orange, jaune et jaune vert. Tous ces dépôts de pigments sont fortement fluorescents.

Résultats :

Condition 1 : le latex dilué, chromatographié *immédiatement* après la récolte (témoin) montre 3, 4 ou 5 taches représentant la totalité des acides aminés de ce latex (voir l'expérience II, 3e partie).

Divisons nos résultats en observations faites après 24 heures d'abandon, 48 heures et plus.

Après 24 heures : A. Expérience de décembre 1957.

Conditions 1 et 4 : une partie des bandes ninhydrine positive a disparu.

Conditions 2 et 3 : pas de changement. Le chromatogramme est le même que celui du témoin analysé *immédiatement* après la récolte.

Condition 5 : pas de changement non plus.

Ce premier groupe d'essais montre que l'épargne des enzymes (pas de chauffage) et le délai de 24 heures suffisent pour que surgisse une disparition d'une partie des

taches ninhydrine positive. Le fait que le résultat est le même, sans streptomycine (1) ou avec (4), prouve qu'il s'agit d'une action enzymatique du latex et non des ferments de germes joints éventuellement au latex. Les conditions où les enzymes sont détruits par la chaleur (2 et 3), et celles où la température est basse (5), ne permettent pas la disparition des taches d'acides aminés. Nous pouvons bien parler d'acides aminés, car s'il était question de polypeptides digérés par hydrolyse, nous aurions eu, au contraire, production de nouvelles taches ninhydrine positive.

Après 48 heures et plus :

Conditions 1 et 4 : toutes les taches d'acides aminés ont disparu, sauf une. Cette dernière, la seconde à partir du spot, persiste jusqu'à la fin de l'expérience, soit 40 jours.

Conditions 2 et 3 : pas de changement ; l'aspect chromatographique, comparable à celui du témoin analysé immédiatement, reste identique jusqu'à la fin de l'expérience.

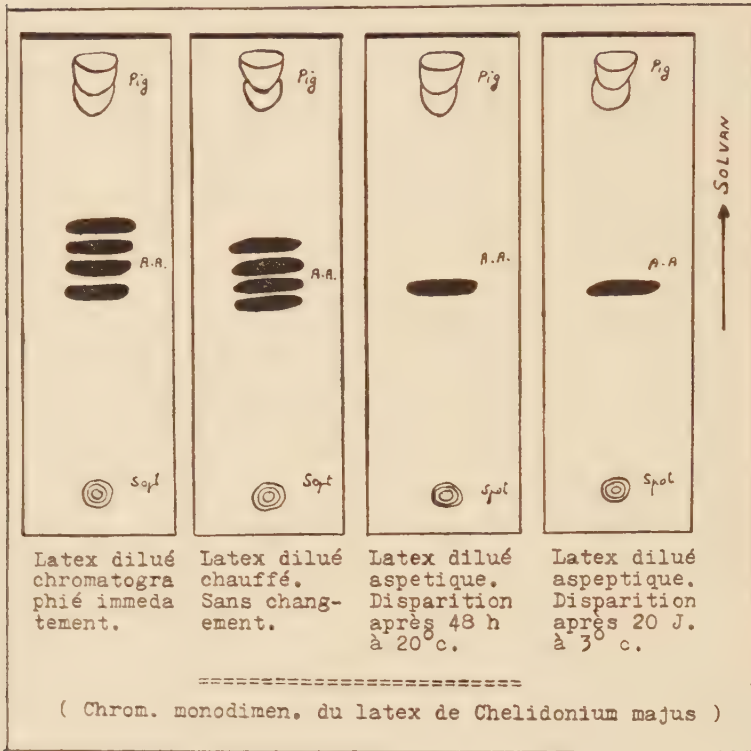
Condition 5 : durant les vingt premiers jours de l'observation, on constate une diminution progressive de l'intensité des taches ninhydrine positive. Après le 20^e jour, l'image devient égale à celles obtenues dans les conditions 1 et 4. On conclut que, malgré la basse température, à la longue, l'action enzymatique s'est déroulée. Le rôle de germes infectieux est éliminé par la présence de streptomycine.

B. Expériences de juin 1958

En refaisant des expériences analogues en juin 1958, sur des plantes prêtes à fleurir * (avant floraison), nous avons eu la surprise de constater que le latex prélevé à cette époque ne possédait pas le pouvoir éliminatoire (dégradation enzymatique) des taches d'acides aminés que nous avons observé à plusieurs reprises dans les périodes postérieures à la fructification.

* La floraison tardive de ce lot de plantes était due à un habitat mal éclairé.

Figure 13 schématise notre expérience.



Conclusions

1° Nous enregistrons, tout d'abord, l'existence d'un système enzymatique présent dans le latex de chélidoine, capable de faire disparaître la majeure partie des acides aminés libres présents dans ce latex. Cette action enzymatique, ne pouvant être imputée aux sécrétions bactériennes ou fungiques, dérive de ferments solubles accompagnants le latex. Nous avons vu dans l'introduction de notre mémoire que les latex sont souvent accompagnés de **ferments divers**. Nous pouvons donc ajouter à la liste déjà connue de ces enzymes une animo-oxydase qui dégrade une grande partie des acides aminés et leur fait perdre leur réactivité avec la ninhydrine.

Les expériences qui conduisent à ces constatations ont été faites *in vitro*, c'est-à-dire que l'autodégradation des acides aminés se déroule dans un latex dilué et à l'air. Il ne nous est donc pas possible de décider si de semblables dégradations se réalisent *in vivo*, c'est-à-dire dans le latex retenu au sein de laticifères intacts, soumis à des conditions oxydatives moindres. On a vu, en effet, qu'à son arrivée à l'air, le latex de chélidoine vire de couleur, passe du jaune au brun, et se couvre d'une pellicule due à la coagulation de certains éléments du latex.

Même si des dégradations ont lieu *in vivo*, il est probable qu'elles sont compensées par la production nouvelle d'acides aminés.

2° Nos expériences montrent encore que cette activité enzymatique varie au cours des saisons : nulle ou imperceptible par nos moyens d'investigation avant la floraison, elle devient marquée durant la période de fructification.

3° Il y a lieu de rapprocher ces deux conclusions de celles faites sur le spectre des acides aminés, tel qu'il nous est fourni par nos expériences (voir 3e partie, exp. II) de chromatographie bidimensionnelle et de chromatographie-ionophorèse. Ces mesures nous avaient révélé que le spectre est riche en acides aminés et polypeptides avant la floraison, et pauvre pendant la fructification.

PERIODE	ACIDES AMINES	ELIMINATION ENZYMATIQUE D'ACIDES AMINES
Avant la floraison	augmentent	nulle
Après la fructification	diminuent	marquée

Les résultats de ces deux méthodes, l'une concernant la composition en acides aminés du latex, et l'autre l'activité enzymatique de ce latex, fournissent des résultats concordants. Tout se passe donc, comme si la période qui précède la floraison était caractérisée par l'abondance d'acides aminés et par une pauvreté durant la période postérieure à la fructification.

Quels que soient les mécanismes d'apparition et de disparition de ces acides aminés, il n'en reste pas moins que le latex est un indicateur précieux du métabolisme végétal et des changements qu'il subit au cours du développement de la plante. Une telle conclusion est précieuse pour les physiologistes qui cherchent à établir les conditions correspondant à la mise à fleur. Par ailleurs et d'une façon plus générale, le latex nous apparaît, à cet égard, comme un miroir réfléchissant les principaux événements métaboliques de la vie de la plante. Une conclusion de ce genre écarte l'hypothèse du caractère inutile ou de substance déchet du latex.

BIBLIOGRAPHIE

- 1° ALCOCK, M. et J. CANNELL : Effet de la température dans la chromatographie des sucres. *Nature*, 1956, 177, 327.
- 2° BALLY W. : Le caoutchouc. Les cahiers CIBA, N° 40, vol. 4. Bâle, mars 1952.
- 3° BOISSONAS R. A. : Séparation rapide des acides aminés par chromatographie ascendante, bidimensionnelle sur le papier. *Helv. Chim. Acta*, 1950, 33, 1966.
- 4° BOUREAU : Anatomie végétale. Tome I. Presses univ. de France.
- 5° CANDOLLE M. A. de : Introduction à l'étude de la botanique, 1835, p. 65.
- 6° CHOLLET M. M. : Application de la microchromatographie sur papier à l'étude des divers hétérosides. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1954, 101, 390.
- 7° CHOLLET M. M. : Influence de la température et de la teneur en eau de la phase entraînante sur la valeur du Rf dans la microchromatographie sur papier des divers oses et osides. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1954, 101, 378.
- 8° CHODAT R. : Principe de Botanique, 1907, pp. 144, 344-345.
- 9° CONSDEN R., GORDON A. H., MARTIN A. J. P. et R. L. M. SYNGE : a) *Biochem. J.*, 1944, 38, 224 ; b) *Biochem. J.*, 1946, 40 ; c) *Biochem. J.*, 1947, 41, 596.

- 10° CORTESI R. : a) Manuel pharmaceutique, Paris, 1957 ; b) Recherches sur le Laurier-Rose. Bull. Soc. Bot. Gen., 32/I, 2e série, 1941. Thèse, 1939.
- 11° CZAPEK F. : Biochemie der Pflanzen, 1921, 3, 710.
- 12° DANGEARD P. : Cytologie végétale et cytologie générale. Paris, Lechevalier P., 1947.
- 13° DOMANGE L. : L'évolution de la chimie analytique, ses conséquences sur le contrôle des médicaments. J. pharm. Belg., 1951, Nos 11-12, p. 339.
- 14° ESPEN J. van : Aperçu sur la chromatographie, son intérêt dans l'analyse des médicaments. J. pharm. Belg., 1950, Nos 5-6, p. 130.
- 15° FERRAND M. : Observations sur les variations de la concentration du latex insitu par la microméthode de la goutte de latex. Publication INEAC, série scientifique No 22, 1941.
- 16° FREY-WYSSLING A. : Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin, p. 302-309, 1935.
- 17° GOODAL R. R. et A. A. LEVI : Nature, 1946, 158, 675.
- 18° GIRARD A. R. : Tissus sécrétrices. Conférence à Genève, 1957.
- 19° GUILLIERMOND A. et G. MANGENOT : Traité de cytologie végétale, pp. 463, 503, 507, 609.
- 20° JAMINET F. : La microchromatographie de partage sur papier dans l'analyse phytochimique. J. pharm. Belg., 1953, 8, 339, et 1953, 9, 10, 449.
- 21° Journée de la chromatographie sur papier. Soc. chim. de France, Paris, mai 1952.

- 22° KARRER P. : Traité de chimie organique. Griffon, 1948.
- 23° KIGER J. : Latex et résines des diverses espèces d'Euphorbia. Thèse en pharmacie, Strasbourg, 1940-1941.
- 24° KLEIN G. : Enzymes du latex, IV, p. 959.
- 25° KOPAEZEWSKI W. : Physio-chimie du latex.
- 26° LEDERER E. : a) Introduction ; aspects théoriques et pratiques de la chromatographie sur papier. Journée de la chromatographie sur papier, Paris, 1952 ; b) Progrès récents de la chromatographie. Paris, Hermann et Cie, éd., 1949.
- 27° LEDERER E. et M. LEDERER : Chromatography. Elsevier Publishing Co., 1955.
- 28° LHOEST W. : Colorants synthétiques en usage dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. J. pharm. Belg., 1953, Nos 5-6, p. 260, et 1953, Nos 7-8, p. 731.
- 29° LINSKENS H. F. : Papierchromatographie in der Botanik. Springer Verlag, 1955.
- 30° MACHEBŒUF M., P. REBEYROTTE, J.-M. DUBERT et M. BRUNERIE : Microelectrophorise sur papier.
- 31° MACHEBŒUF et ALLOUF : Chromatographie sur papier sur deux phases de solvants agissant simultanément. Bull. Soc. Chimie Biol., 1952, 34, Nos 1 et 2.
- 32° METCALFE C. R. et L. CHALK : Anatomy of the dicotylidons.

- 33° MUNIER et MACHEBŒUF : Bull. Soc. Chimie Biol. a) 1949, 31, 1144 ; b) 1950, 32, 904, et c) 1951, 33, 846.
- 34° NITSCH J. et C. NITSCH : Séparation chromatographique des auxines de l'ovule fécondé de haricot à différents stades de son développement. Bull. Soc. Bot. Fr., 1955, 102, 528.
- 35° NOVELLIE L. : Nature, 1950, 166, 745.
- 36° PAECH K. et M. V. TRACEY : Moderne Methoden der Pflanzen-analyse. IIIe page 450 à 496. Ve page 1 à 18. Acides aminés. Anthocyanes Chalcones et Flavones.
- 37° PALMER K. H. : Recherches sur quelques Ructacées africaines à alcaloïdes du genre Fagara. 1956.
- 38° PARIS R. : a) Utilisation de la chromatographie et électrophorèse pour l'étude des médicaments d'origine végétale. J. Pharm. Belg., 1956, 38, 9 ; b) Chromatographie sur papier de quelques dérivés flavoniques. Bull. Soc. Chimie Biol., 1952, 34, 767.
- 39° PARTRIDGE S. M. : a) Nature, 1946, 158, 270 ; b) b) Nature, 1949, 164, 443 ; c) Biochem., 1948, 42, 238 ; d) Biochem. 1948, 42, XLVIII.
- 40° PERROT E. : Matières premières usuelles du règne végétal. Tome I, p. 204, 1249. Tome II, p. 1227.
- 41° POLONOVSKI M. : Biochimie médicale. Paris, Masson et Cie.
- 42° POLONOVSKI M., F. PENDARANDA et L. ROBERT : Etudes critiques d'une méthode de dosage des acides aminés par chromatographie sur papier. Bull. Soc. Chimie Biol., 1953, 35, 801.

- 43° POPOVICI H. : Contribution à l'étude des laticifères, 1926.
- 44° REICHSTEIN T. et J. von EUW : Helv. Chim. Acta, 1938, 21, 1197.
- 45° REICHSTEIN T. et C. MONTIGEL : Helv. Chim. Acta, 1939, 22, 1212.
- 46° RICHES J.-P. et E. G. B. GOODING : Studies in the physiology of latex. The New Phytologist, 1952, 51, No 1 (April).
- 47° ROUSSEAU J. : Localisation des cellules sécrétrices chez quelques rubiacées. Bull. Soc. Bot. Fr., 1953, 100, 36.
- 48° SACHS J. : Traité de botanique, 1874, p. 149.
- 49° SANNIE Ch. et H. SAUVAIN : Les couleurs des fruits et des fleurs : Anthocyanes et Flavones. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Série B, Botanique. Tome II, 1952.
- 50° STEIGER M. et T. REICHSTEIN : Helv. Chim. Acta, 1938, 21, 546.
- 51° SCHAFFSTEIN : Untersuchungen an ungegliederten Milchröhren. Bot. Zbl., 1932, 49, 197.
- 52° THOMAS P. et D. REYMOND : Technique de biochimie. Paris, Edition Baillière, 1958.
- 53° TURIAN D. : Exaltation de l'activité phosphatase dans le latex d'*Euphorbia verrucosa* L. parasitée par *Uromyces scutellatus* (Schr.) Lév. Ses relations avec le métabolisme auxinique. « Phytopathologische Zeitschrift », 1957, 28, No 3, 275-280. Berlin et Hambourg, Paul Parey Verlag.

- 54° VIEJO J.-P. : Identification des drogues et contrôle des médicaments d'origine végétale par chromatographie sur papier. Thèse, 1956.
- 55° WINSTEIN W. A. et A. M. SPARK : Science, 1947, 106, 192.
- 56° WUNDERLY C. : Electrophorèse sur papier. Vigot frères, éditeurs, 1956.
-

TABLE DES MATIÈRES

I. — PARTIE GENERALE :

	Page
1. Introduction	9
2. Définition du latex	10
3. Familles de plantes à latex	11
4. Tissus à latex	13
5. Informations générales sur la composition du latex	17

II. — TECHNIQUES :

1. Principe de la chromatographie sur papier	25
2. Technique de la chromatographie sur papier	25
3. Ionophorèse	32

III. — PARTIE EXPERIMENTALE :

1. Effet de la maladie de la rouille sur le spectre des acides aminés du latex d' <i>Euphorbia Cyparissias</i> L. :	
Introduction	37
Matériel et techniques	38
Résultats	41
Conclusions	45
2. Influence de la saison sur le spectre des acides aminés du latex de <i>Chelidonium majus</i> L. :	
Introduction	47
Matériel et techniques	48

Résultats avant la floraison	50
Résultats pendant la fructification	53
Conclusions	56
3. Dégradation des acides aminés dans le latex de <i>Chelidonium majus</i> L. :	
Introduction et techniques	58
Résultats	60
Conclusions	63
IV. — BIBLIOGRAPHIE	65

